

НЕФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

**Манухина Е.Б.¹, Пшенникова М.Г.¹, Горячева А.В.¹,
Машина С.Ю.¹, Покидышев Д.А.¹, Хоменко И.П.¹,
Александрин В.В.², Барсков И.В.³, Малышев И.Ю.¹**

***ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН¹; НИИ
фармакологии РАМН им. В.В. Закусова²; Институт мозга РАН³,
Россия***

Известно, что как гиперпродукция, так и дефицит оксида азота (NO) играют важную роль в развитии нейродегенеративного поражения мозга при болезни Альцгеймера (БА). Избыток NO, продуцируемый астроцитами и микроглией, оказывает прямое нейротоксическое действие, тогда как одновременный дефицит эндотелиального NO приводит к дисфункции эндотелия мозговых сосудов и гипоперфузии мозга [1]. Поэтому важной задачей является поиск средств, способных защитить мозг от нейродегенеративного поражения за счет разнотипного модулирования синтеза NO.

Адаптация организма к факторам среды, таким как специальные диеты, физические нагрузки, стресс, тепло и в особенности периодическая гипоксия, сопровождается хроническим стимулированием синтеза NO. По-видимому, именно это обеспечивает терапевтическую и профилактическую эффективность адаптации при сердечно-сосудистых заболеваниях, связанных с дисфункцией эндотелия.

В то же время показано, что такая адаптация способна предупредить не только дефицит, но и гиперпродукцию NO при инфаркте миокарда и шоках разного типа [2].

В настоящем исследовании была оценена возможность предупреждения нейродегенеративного поражения мозга при экспериментальной БА с помощью адаптации к гипоксии и анализе роли NO в формировании адаптационной защиты.

БА моделировали путем билатерального введения в n. basalis magnocellularis самцов крыс Вистар нейротоксичного фрагмента бета-амилоида (Ab) (25-35). Крыс адаптировали к гипобарической гипоксии в барокамере в течение 14 дней до введения Ab. Адаптацию проводили по 4 часа ежедневно при разрежении воздуха, соответствующем 4000 м над уровнем моря.

Через 14 дней после введения Ab у животных оценивали влияние нейродегенеративного повреждения мозга, вызванного Ab, на когни-

тивную функцию с использованием теста условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [3]. Для теста УРПИ крысу помещали в освещенную камеру, соединенную с темной камерой, и регистрировали латентный период ее перехода в темную камеру. При входе в темную камеру крыса получала серию ударов током.

Через 24 часа животных подвергали повторному тестированию и снова регистрировали латентный период входа в темную камеру. Чем лучше память животного, тем больше разница между латентными периодами второго и первого тестирования.

У крыс после инъекции Ab разность между латентными периодами захода в темную камеру была достоверно меньше, чем у контрольных крыс, что соответствует ухудшению запоминания (Рис. 1). У адаптированных крыс после введения Ab дельта латентного периода почти отличалась от контроля, т.е. адаптация в значительной мере предупреждала ухудшение памяти крыс, вызванное Ab.

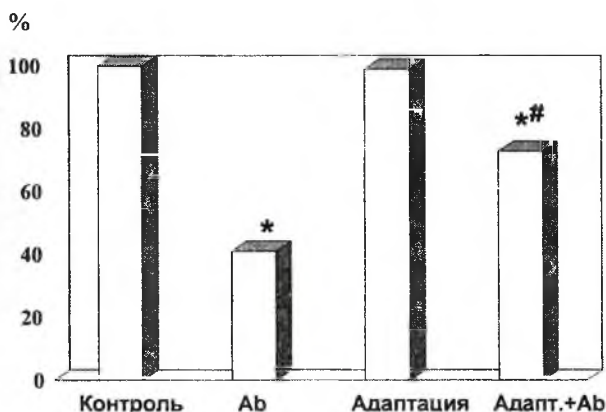


Рис. 1. Влияние адаптации к гипоксии на нарушения памяти крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера. Диаграммы отражают разность между латентными периодами захода в темную камеру между первым и вторым тестированием (тест УРПИ) в % от контроля. Чем больше разность, тем выше степень запоминания. *Достоверные отличия от контроля, $p < 0,05$; #Достоверные отличия от Ab, $p < 0,05$.

Защитный эффект адаптации был подтвержден морфологическим исследованием. У крыс, получивших инъекцию Ab, в 10-мкм срезах мозга, окрашенных по Нисслю, выявлялись многочисленные погибшие нейроны. В мозге крыс, получивших инъекцию Ab после адаптации к гипоксии, погибшие нейроны отсутствовали. Изучение роли NO

в нейродегенеративном повреждении, вызванном Ab, и защитном эффекте адаптации к гипоксии показало, что развитие экспериментальной БА сопровождается снижением общего синтеза NO, который оценивали спектрофотометрически по уровню в плазме стабильных метаболитов NO нитритов и нитратов (Рис. 2А) [3]. Адаптация к гипоксии умеренно стимулировала синтез NO и достоверно ограничивала его снижение после инъекции Ab. Курсовое введение животным ингибитора синтеза NO N^ω-нитро-L-аргинина (L-NNA, 20 мг/кг, в/б, ежедневно в течение 14 дней) само по себе ухудшало способность крыс к запоминанию и усиливало повреждающий эффект Ab (Рис. 2Б). В то же время, аналогичный курс донора NO динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ, 200 мкг/кг, 14 дней) почти полностью предупредил нарушения памяти у крыс. Само по себе введение ДНКЖ на запоминание не влияло.

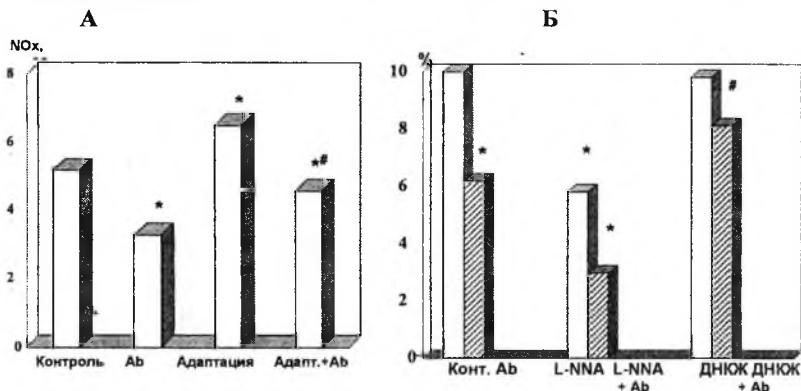


Рис. 2. Роль NO в защитном эффекте адаптации к гипоксии при экспериментальной болезни Альцгеймера

А. Адаптация к гипоксии предупреждает снижение продукции NO, вызванное введением Ab. Диаграммы отражают концентрацию нитритов и нитратов в плазме крыс.

Б. Влияние ингибитора синтеза NO и донора NO на нарушения памяти крыс, вызванные введением Ab. Диаграммы отражают разность между латентными периодами захода в темную камеру между первым и вторым тестированием (тест УРПИ) в % от контроля. *Достоверные отличия от контроля, $p < 0,05$; #Достоверные отличия от Ab, $p < 0,05$.

Регистрация локального мозгового кровотока в бассейне средней мозговой артерии с помощью лазерной доплеровской флоуметрии обнаружила, что адаптация к гипоксии достоверно повышала базальный мозговой кровоток (Рис 3А).

Поскольку донор NO ДНКЖ вызывал аналогичное увеличение

мозгового кровотока, можно думать, что этот эффект в обоих случаях был связан с повышением уровня NO.

Введение крысам Ab вызвало ослабление эндотелийзависимой дилатации (ЭЗД) мозговых сосудов в ответ на ацетилхолин почти в 4 раза (Рис. 3Б). Адаптация к гипоксии сама по себе не влияла на ЭЗД, но почти полностью предупреждала дисфункцию эндотелия мозговых сосудов при введении Ab.

При повышении уровня NO в плазме крови его избыток связывается в комплексы – преимущественно ДНКЖ и S-нитрозотиолы, которые образуют так называемое депо NO. Депонирование NO рассматривается как механизм защиты от токсического действия избытка NO, и появление депо NO в стенках сосудов может служить косвенным признаком гиперпродукции NO [4]. Депо NO в мозговых сосудах выявляли по вазодилаторному ответу на N-ацетилцистеин, который разрушает NO-содержащие комплексы в сосудистой стенке с выделением свободного NO. Величина вазодилатации отражает объем депо NO, который прямо коррелирует с уровнем продукции NO [5].

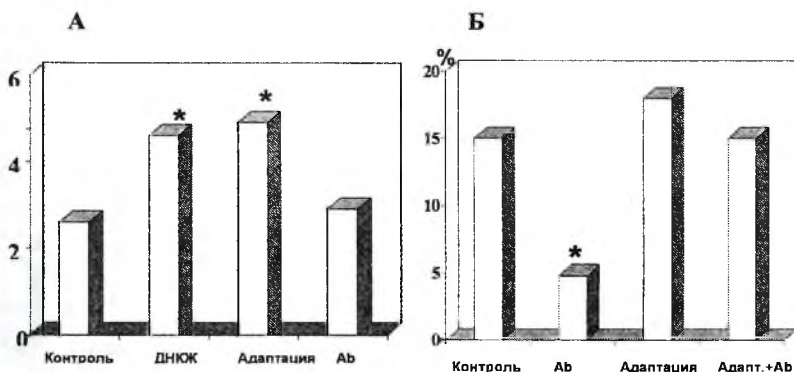


Рис.3. Адаптация к гипоксии предупреждает дисфункцию эндотелия мозговых сосудов у крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера.

А. Адаптация к гипоксии и донор NO повышают базальный мозговой кровоток.

Диаграммы отражают мозговой кровоток в условных единицах перфузии. *Достоверные отличия от контроля, $p < 0,05$.

Б. Адаптация к гипоксии предупреждает нарушения эндотелийзависимой дилатации мозговых сосудов, вызванные введением Ab.

Диаграммы отражают увеличение мозгового кровотока в ответ на ацетилхолин в % от исходной величины. *Достоверные отличия от контроля, $p < 0,05$

У крыс, получивших инъекцию Ab, выявлялось депо NO, объем которого был сравнительно небольшим (Рис. 4А). По-видимому, ги-

перпродукция NO, индуцированная Ab, привела к депонированию его избытка. Адаптация к гипоксии также вызывала формирование депо NO. У крыс, получивших инъекцию Ab после адаптации к гипоксии, объем депо NO оказался достоверно больше, чем у неадаптированных крыс, получивших Ab. По-видимому, в ходе адаптации к повышенному уровню NO способность сосудов депонировать NO увеличивается, и этот механизм обеспечивает защиту сосудов в условиях последующей патологической гиперпродукции NO [5].

Для проверки этого предположения было изучено влияние адаптации крыс к хроническому изменению уровня NO в плазме на эффективность его депонирования в сосудистой стенке [6]. Эффективность депонирования NO оценивалась по максимальному количеству NO, которое потенциально может быть связано в депо. Для этого определялась величина депо NO, образовавшегося в стенке изолированного сосуда после его инкубации с избытком донора NO [6]. Введение крысам донора NO ДНКЖ в дозе 200 мкг/кг в течение 5 дней подряд приводило к достоверному увеличению эффективности депонирования NO (Рис. 4Б).

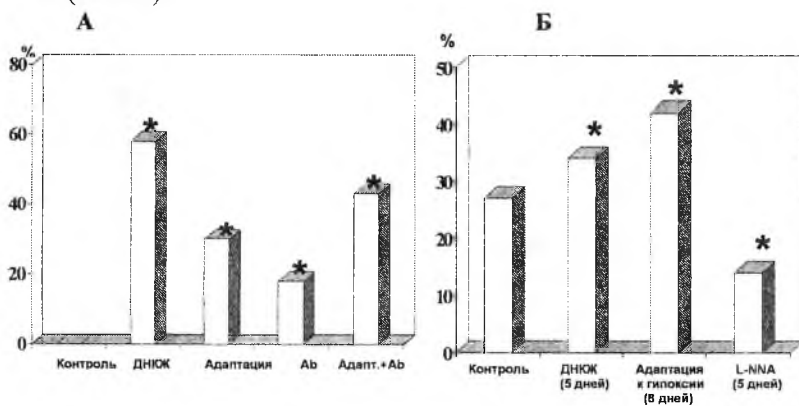


Рис. 4. Депонирование NO в стенке сосудов как возможный механизм защиты от гиперпродукции NO.

А. Депо NO в мозговых сосудах. Диаграммы отражают увеличение мозгового кровотока в ответ на N-ацетилцистеин в % от величины кровотока в покое.

Б. Изменение эффективности депонирования NO в стенке аорты крыс при хроническом повышении и снижении уровня NO в организме.

Диаграммы отражают объем депо NO, сформировавшегося в аорте крысы в результате инкубации с донором NO в % от величины сокращения в ответ на норадреналин. *Достоверные отличия от контроля, $p < 0,05$.

Напротив, при хроническом введении ингибитора синтеза NO L-NAME с питьевой водой эффективность депонирования NO снизилась

почти в два раза. Аналогичное действие оказывала адаптация к гипоксии: у адаптированных крыс способность к связыванию избытка NO в депо существенно увеличивалась по сравнению с неадаптированным контролем. Таким образом, изменение эффективности связывания NO в депо представляет собой один из механизмов адаптации сосудов к хроническому повышению или снижению уровня NO в организме.

Результаты проведенного исследования показывают, что адаптация к гипоксии обладает двойным защитным действием при нарушениях мозгового кровообращения при экспериментальной БА. С одной стороны, такая адаптация предупреждает дисфункцию эндотелия мозговых сосудов, а с другой стороны обеспечивает адаптивный ответ сосудов на гиперпродукцию NO, увеличивая эффективность связывания его избытка в стабильные комплексы. Полученные данные позволяют рассматривать адаптационную профилактику нарушений мозгового кровообращения как перспективный подход, который может найти применение в клинике БА.

Работа выполнена при поддержке NWO (грант 047-014-016) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант 03-04-49065)

Литература

1. Totte de la J.C. Vascular basis of Alzheimer's pathogenesis. // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2002. – V. 977. – P. 196-215.
2. Манухина Е.Б., Машина С.Ю., Власова М.А., Смирин Б.В., Покидышев Д.А., Малышев И.Ю. Роль свободного и депонированного оксида азота в адаптации к гипоксии сердечно-сосудистой системы. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2004. – Т. 3. – С. 4-11.
3. Манухина Е.Б., Висгант Ф., Торшин В.И., Горячева А.В., Хоменко И.П., Круглов С.В., Машина С.Ю., Покидышев Д.А., Попкова Е.В., Пшенникова М.Г., Власова М.А., Зеленина О.М., Малышев И.Ю. Перспективы применения немедикаментозных подходов при болезни Альцгеймера. // Известия РАН. Серия Биологическая. – 2004. – Т. 31. – № 4. – С. 382-395.
4. Манухина Е.Б., Смирин Б.В., Малышев И.Ю., Стокле Ж.-К., Мюллер Б., Солодков А.П., Шебеко В.И., Ванин А.Ф. Депонирование оксида азота в сердечно-сосудистой системе. // Известия РАН. Серия Биологическая. – 2002. – № 5. – С. 585-596.
5. Manukhina E.B., Malyshev I.Yu., Smirin B.V., Mashina S.Yu., Saltykova V.A., Vanin A.F. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia. // Nitric Oxide – 1999. – V. 3. – P. 393-401.
6. Власова М.А., Смирин Б.В., Покидышев Д.А., Машина С.Ю., Ванин А.Ф., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Механизм адаптации сосудистой системы к хроническому изменению уровня оксида азота (NO) в организме. // Бюлл. exper. биол. мед. – 2006 (в печати).